异叶泽兰的遗传多样性和居群历史动态研究

潘跃芝，赵玉娟，龚洵*

（中国科学院昆明植物研究所 云南省野生资源植物研发重点实验室，昆明 650201）

摘要：异叶泽兰属于菊科泽兰属，是该属分布海拔相对较高的植物，分布在青藏高原东部和横断山海拔 1 700~3 000 m 左右的地区。本研究利用 *ycf6-psbM* 和 *rpl32-trnL* 两个叶绿体 DNA（cpDNA）片段以及核 DNA 片段 ITS（nITS）作为分子标记，研究了异叶泽兰的遗传多样性及其分布特征，同时探讨了其居群历史动态。叶绿体片段联合分析结果显示单倍型多态性指数 *H*d 为 0.656，核苷酸多态性（π）为 0.001 61；而 ITS 的平基因型多态性指数 *H*d 为 0.687，核苷酸多态性为 0.002 35。因此异叶泽兰在物种水平遗传多样性水平不高。cpDNA 和 nITS 分析结果都显示异叶泽兰居群水平总的遗传多样性大于居群内平均遗传多样性，遗传变异主要发生在居群间，居群间存在明显的遗传分化（cpDNA：*G*st= 0.679，*N*st= 0.655，F_{ST} = 0.655；nITS：*G*st = 0.543，*N*st = 0.370，F_{ST} = 0.584）。但是，由于 *N*st 值小于 *G*st 值，异叶泽兰的分布不具有明显的谱系地理结构。基于单倍型地理分布以及 Network 分析推测横断山区南部（川西南-滇西北）和云南中部可能是异叶泽兰在第四纪冰期时的两个避难所，中性检验和失配分析的结果支持异叶泽兰在冰期后未发生过居群扩张。

关键词：异叶泽兰，遗传多样性，居群历史动态，横断山区，避难所

中图分类号：Q948.15　　　　**文献标识码：**A

开放科学（资源服务）标识码（OSID）：



Study on genetic diversity and population demography of *Eupatorium heterophyllum* (Asteraceae)

PAN Yuezhi, ZHAO Yujuan, GONG Xun*

(*Department of Economic Plants and Biotechnology*, *Yunnan key Laboratory for Wild Plant Resources*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kumming 650201, China)

Abstract: *Eupatorium heterophyllum*, belonging to *Eupatorium* (Asteraceae), is distributed in the eastern Qinghai-Tibet Plateau and Hengduan Mountain regions, and has relatively high elevation in comparison with those of other species within this genus. A survey of two chloroplast DNA (cpDNA) fragments (*ycf6-psbM* and *rpl32-trnL*), and one nuclear DNA fragment ITS (nITS) was carried out to assess the genetic diversity and infer the population demography history of *E.*

基金项目：国家重点研发计划项目（2017YFC0505200）[Supported by National Key Research and Development Project (2017YFC0505200)]。

作者简介：潘跃芝（1973-），女，博士，主要从事植物进化与遗传资源评价研究，（E-mail）panyuezhi@mail.kib.ac.cn。

通信作者：龚洵，博士，研究员，主要从事植物进化与保护遗传学研究，（E-mail）gongxun@mail.kib.ac.cn。

heterophyllum. The results showed that the haplotype diversity (*H*d) of combined cpDNA fragments was 0.656, and the nucleotide diversity (π) was 0.001 61 at the species level. These two index values of ITS were 0.687 and 0.002 35, respectively. All these data showed that *E. heterophyllum* had relatively low level of genetic diversity. Both cpDNA and ITS data indicated that the total genetic diversity of *E. heterophyllum* was higher than the average value of populations, and the genetic variations occurred mainly among populations. Significant genetic differentiation exists among populations (cpDNA：*G*st = 0.679，*N*st = 0.655，F_{ST} = 0.655；nITS：*G*st = 0.543，*N*st = 0.370，F_{ST} = 0.584). However, there is no obvious phylogeographical structure occurred in *E. heterophyllum* (*N*st < *G*st). Both the pattern of haplotype distribution and Network structure of haplotypes indicated that the southern Hengduan Mountian regions and central Yunnan province probably were the two refugia for *E. heterophyllum* during the Quaternary Glaciation period. And *E. heterophyllum* has not undergone population expansion after glacial period which was supported by the neutral test and mismatch analysis.

Key words: *Eupatorium heterophyllum*, genetic diversity, population demography, Hengduan mountains, refugium

异叶泽兰（*Eupatorium heterophyllum*）属于菊科泽兰属（*Eupatorium*），该属曾被认为是分布在美洲及欧亚大陆的菊科大属，约 600 种，被国人所熟知的外来入侵物种紫荆泽兰就曾被置于该属，拉丁名为 *E. adenophora* (林容等，1985；Chen et al., 2011)。但后来该属被重新界定为仅分布在欧亚大陆的北极-第三纪分布小属，仅包含 45 个种左右（King & Robinson, 1970），而分布于中南美洲的类群不再被归入该属内，如紫荆泽兰被归并到紫茎泽兰属 *Ageratina*，定名为 *Ageratina adenophora*（King & Robinson, 1970；Chen et al., 2011）。被重新定义的泽兰属属北温带类群，北美分布有 27 种，东亚有 25 种，1 种在欧洲，是个典型的东亚北美间断分布类群(Schilling et al, 1999; Ito et al., 2000)，在中国大陆和台湾地区约分布有 14 种，其中 6 种为特有种（Chen et al., 2011）。系统发育和植物地理学分析表明，该类群为北美起源和分化，其一分支大约在 6.18~11.6 Ma（晚第三纪）时经白令海峡陆桥扩散至欧亚大陆，随后在亚洲经历了辐射演化（Schilling et al., 1999; Schmidt & Schilling, 2000）。其中，东亚分布的种类在形态表型以及染色体核型上差异都比较小（Watanabe et al., 1990），物种间可能存在自然杂交的现象（Schmidt & Schilling, 2000）。在中国分布的约 14 个种中，异叶泽兰分布在青藏高原东部和横断山海拔 1 700~3 000 m 左右的地区，是泽兰属唯一一个分布海拔较高的物种，生于山坡林下、林缘、草地及河谷（Chen et al., 2011），其化学成分在不同居群间存在差异（Saito et al., 2014）。

横断山区是泛北极植物区系的一个区（李锡文和李捷，1993），该地区的种子植物区系基本上是温带性质的，尤其是北温带成分，这其中许多又是北极-第三纪植物，这类植物在中新世以后伴随气温的急剧下降而南迁。秦岭-黄河一线并环沿四川盆地可能是北极第三纪成分向喜马拉雅-横断山迁移的主要路线（孙航，2002）。该地区在第四纪冰期时未被统一的大冰盖覆盖，同时又受东亚季风气候和印度季风气候的影响，这给许多植物类群提供了避难所，尤其是海拔相对较低的地区（Qiu et al., 2011；更吉卓玛等，2018）。在冰后期，横断山区成为现代温带植物的重要起源地和辐射地（李锡文和李捷，1993；于海彬和张镱锂，2013），物种多样性和遗传多样性都非常高（Yu et al., 2019）。异叶泽兰作为泽兰属在高海拔地区分布物种，在第四纪冰期及冰期后存在怎样的居群历史动态，现有分布居群又具有怎样的遗传多样性分布式样。本文基于两个叶绿体 DNA 片段（*ycf6-psbM* 和 *rpl32-trnL*）和核 DNA 片段 ITS 的测序数据，利用群体遗传学和谱系地理学的分析方法，对以上问题进行了初步的探讨和回答。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中我们共采集甘肃、四川、云南及贵州 27 个居群的 261 个样本的叶片材料(表 1；图 1，图 2)， 硅胶干燥后带回实验室。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

依据 CTAB 法（Doyle & Doyle, 1987）提取总 DNA。对 nrDNA 的 ITS 区段进行 PCR 扩增，扩增引物为 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC) 和 ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White et al., 1990)，对 cpDNA 的 *ycf6-psbM* 和 *rpl32-trnL* 区段进行 PCR 扩增，扩增引物为 *ycf6*F（ATGGATATAGTAAGTCTYGCTTGGGC）和 *psbM*R（ATGGAAGTAAATATTCTYGCATTTATTGCT）（Shaw et al., 2005）及 *rpl32*F(CAGTTCCAAAAAAACGTACTTC) 和 *trnL*R（CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT）(Shaw et al., 2007)。ITS 的 PCR 扩增条件为 95 ℃变性 2 min, 接着以 95 ℃ 30 s，53 ℃ 1 min，65 ℃ 1 min 的条件循环 30 次，最后在 65 ℃条件下延伸 7 min。*ycf6-psbM* 的 PCR 反应条件与 ITS 基本一致，但其退火温度为 52 ℃。 *rpl32-trnL* 的 PCR 扩增条件为 80 ℃变性 2 min, 接着以 95 ℃ 1 min， 50 ℃ 1min，65 ℃ 1.5 min 的条件循环 33 次，最后在 65 ℃条件下延伸 5 min。PCR 产物用上海生工生物技术有限公司的纯化试剂盒 W5211 进行纯化，纯化产物用 ABI3730 测序仪进行双向测序。

1.3 数据分析

测序的原始数据用 DNAStar 软件包的 Seqman（DNAStar，Inc.，Madison，USA）进行拼接，用 Clustal X (Thompson et al., 1997)进行比对。用 PAUP*4.0b10（Swofford，2002）软件将两个叶绿体片段的序列进行联合。用 DnaSP 5.10（Librado & Rozas, 2009）统计单倍型数目和变异位点特征，以及单倍型多样性(*H*d)和核苷酸多样性(π)；利用该软件进行中性检验，包括 Tajima's *D* 和 Fu and Li's *F**检验，在居群扩张模型下推测居群大小变化。运用 ArcGis10.2 编辑各单倍型在地形图上的地理分布。利用 Network5.011 (http://www.fluxus-engineering.com)构建单倍型网状进化关系。

用 Permut（Pons & Petit, 1996）软件计算计算居群内平均遗传遗传多样性 *H*s、总的遗传多样性 *H*t 和居群间遗传分化系数 *G*st 和 *N*st 值。

应用 Arlequin 3.5（Excoffier & Lischer, 2010）软件包中的分子变异分析(AMOVA)分别检测该研究物种在居群间和居群内的遗传变异水平。利用该软件对单倍型分布的 *F*st 进行评价，同时利用该软件包中的 Mantel 统计学检验，比较地理距离矩阵与平均遗传距离矩阵之间的相关性，并进行 1,000 次重复的显著性检验;此外，失配分析（mismatch distribution analysis）也由该软件来完成,即分别计算歧点观测值与期望值的方差(SSD)、糙度指数(*r*: raggedness index)以及它们的显著性(*P* value)。

表 1 样本采集地信息及各居群遗传多样性参数统计值

Table 1 Information of sampling location and the values of genetic diversity index

居群号 Pop ID	采样地 Location	经度/纬度 Longitude /Latitude	海拔 Altitude (m)	cpDNA 单倍型（序列数） cpDNA Haplotype (sequence number)	cpDNA 核苷酸多态性 cpDNA nucleotide diveristy (π)	cpDNA 单倍型多态性 cpDNA Haplotype Diversity (*H*d)	ITS 单倍型组成（序列数） ITS Haplotype (sequence number)	ITS 核苷酸多态性 cpDNA nucleotide diveristy (π)	ITS 单倍型多态性 ITS Haplotype Diversity (*H*d)
1	甘肃文县 Wenxian, Gansu	104.67°/33.05°	1 700#	H1(9)	0	0	H1(3) H2(2) H3(2) H4(2) H5(6) H15(5)*	0.002 53	0.837
2	四川小金 Xiaojin, Sichuan	102.5°/31.02°	2 300	H1(10)	0	0	H3(10) H12(5)* H13(1) * H14(4)	0.001 68	0.679
3	四川雅江 Yajiang, Sichuan	100.99°/30.03°	2 700	H1(12)	0	0	H3(24)	0	0
4	四川乡城 Xiangcheng, Sichuan	99.87°/28.75°	2 800	H1(2) H7(8)	0.000 61	0.356	H3(20)	0	0
5	四川得荣 Derong, Sichuan	99.53°/28.03°	3 180	H1(10)	0	0	H3(20)	0	0
6	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	99.75°/28.08°	3 600#	H1(4) H7(7)	0.000 88	0.509	H3(22)	0	0
7	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	100.03°/27.5°	2 630	H1(5) H7(5)	0.000 96	0.556	H3(19) H9(1)	0.000 16	0.1
8	云南玉龙 Yulong, Yunnan	100.23°/27.29°	1 650	H1(8) H7(2)	0.000 57	0.327	H3(20) H8(2)	0.000 54	0.173
9	云南维西	99.25°/27.19°	3 000#	H1(10)	0	0	H3(20)	0	0

	Weixi, Yunnan								
10	云南维西 Weixi, Yunnan	99.33 °/27.12 °	2 330	H1(10)	0	0	H3(20))	0	0
11	云南怒江 Nujiang, Yunnan	98.7 °/25.79 °	2 700[#]	H1(9)	0	0	H3(15) H14(3)	0.000 83	0.358
12	云南玉龙 Yulong, Yunnan	99.88 °/26.63 °	2 380	H1(2) H2(5)	0.000 82	0.476	H1(5) H2(5)	0.001 47	0.714
13	云南玉龙 Yulong, Yunnan	100.4 °/26.85 °	2 100	H1(8) H3(1) H9(1) *	0.000 52	0.378	H2(1) H3(16) H8(2) H10(1)	0.001 44	0.363
14	云南永仁 Yongren, Yunnan	101.47 °/26.42 °	1 400[#]	H1(8)	0	0	H1(3) H2(1) H3(2) H4(4) H5(4) H6(2) *	0.003 03	0.858
15	云南宁蒗 Ninglang, Yunnan	100.84 °/27.4 °	2 740	H1(9) H3(1)	0.000 35	0.200	H3(16) H8(2) H9(2)	0.000 83	0.358
16	四川盐源 Yanyuan, Sichuan	101.23 °/27.72 °	3 050	H1(10)	0	0	H3(14) H8(6) H22(2)	0.001 39	0.442
17	四川冕宁 Mianning, Sichuan	28.4 °/102.02 °	2 110	H1(5) H6(6)	0	0	H1(14) H16(5)* H17(3) *	0.009 07	0.550
18	四川九龙 Jiulong, Sichuan	101.72 °/28.53 °	1 600	H1(9) H6(1)	0.001 04	0.200	H1(4) H8(2) H18(8) * H19(6) * H20(4) *	0.005 85	0.737
19	云南昭通 Zhaotong, Yunnan	103.72 °/27.45 °	2 160	H4(2) H11(8)	0.000 31	0.356	H1(9) H2(5) H4(1) H5(5)	0.002 13	0.705
20	云南禄劝 Luquan, Yunnan	102.7 °/26.17 °	2 050	H4(10)	0	0	H1(16) H7(4)	0.000 53	0.337
21	云南寻甸 Xundian, Yunnan	102.84 °/25.9 °	1 100	H7 (1) H8(11)	0.000 29	0.167	H1(22) H7(2)	0.000 25	0.159

22	云南东川 Dongchuan, Yunnan	103.27 °/25.85 °	2 150	H2(1) H8(8) H10(1) *	0.002 06	0.378	H1(17) H7(3)	0.000 42	0.268
23	云南东川 Dongchuan, Yunnan	103.08 °/25.9 °	2 500	H1(1) H4(8)	0.000 19	0.222	H1(16) H11(2)	0.000 33	0.209
24	云南昆明 Kunming Yunnan	102.78 °/25.32 °	2 000#	H1(1) H4(4) H5(5) *	0.002 57	0.644	H1(19) H2(1)	0.000 16	0.1
25	云南澄江 Chengjiang, Yunnan	102.88 °/24.73 °	2 650	H4(10)	0	0	H1(18) H11(2)	0.000 30	0.189
26	云南元江 Yuanjiang, Yunnan	101.8 °/23.65 °	1 760	H11(6)	0	0	H1 (12)	0	0
27	贵州施秉 Shibing, Guizhou	108.1 °/27.1 °	850	H1(2) H3(3)	0.001 04	0.600	H2(2) H3(4) H8(2) H21(2) *	0.003 91	0.8

注：*表示居群特有单倍型；#表示此海拔高度由 GoogleEarthPro 查询得到。

Note: *means private haplotypes; # means data estimated using GoogleEarthPro.

2 结果与分析

2.1cpDNA 数据分析

共有 260 个样本的 *ycf6-psbM* 和 *rpl32-trnL* 同时测序成功，两个片段联合并比对后矩阵长度为 1 179 bp。DnaSP 5.10 分析共生成 11 个单倍型，每个居群的核苷酸多样性（π）、单倍型多样性（*H*d）见表 1。物种水平单倍型多态性指数 *H*d 为 0.656，核苷酸多态性（π）为 0.001 61。

单倍型 H1 主要分布在云南西北部、四川西南部以及甘肃文县和贵州施秉县的 11 个居群中，昆明（居群 24）及东川（居群 23）有少量分布；单倍型 H4 则分布在云南中部的 5 个居群中；H5 仅分布在云南昆明的居群 24 中，H9 仅分布在丽江玉龙县的居群 13 中，H10 仅分布在昆明东川居群 22 中（图 1，表 1）。Network 分析表明，发生频率最高的单倍型 H1 和 H4 位于网状结构的中间位置，单倍型 H3、H10、H11、H8、H5、H6 和 H5 位于网状结构的末端位置（图 3）。

居群的 SSD 值以及糙度指数 *r* 值都为不显著的正值($P > 0.05$)，中性检验表明 Tajima's *D* (-0.59)与 Fu and Li's *F*（-0.06）值虽然均为负值，但不显著小于零 ($P > 0.05$)，失配分布曲线为多峰曲线（图 5），观测值背离了期望值，违背了居群扩张模型。这些结果都表明异叶泽兰居群未发生显著居群扩张。

异叶泽兰总遗传多样性（*H*t）为 0.682，居群内平均遗传多样性（*H*s）为 0.219，居群间遗传分化系数 *G*st 和 *N*st 值分别为 0.679 和 0.655，*N*st 小于 *G*st。AMOVA 分析结果表明，异叶泽兰较多的遗传变异（65.55%）发生在居群间, 仅 34.45%的变异发生在居群内, 固定指数 *F*st = 0.655。遗传距离和地理距离呈正相关，但显著度不高（$r = 0.18$, $P = 0.045$）。

2.2 ITS 分析

共有 261 个样本的 ITS 测序成功，其中 197 个体是纯合体，其余 64 个为杂合体。序列比对后的数据矩阵长度为 638 bp，经软件 DnaSP5.10 的"phase"功能拆分后生成 522 条序列。这 522 条序列共生成 21 种基因型（H1-H21） (图 2，表 1)，物种水平基因型多态性指数 *H*d 为 0.686 9，核苷酸多态性为 0.002 35；每个居群的核苷酸多样性（π）和基因型多样性（*H*d）值见表 1。

分布频率最高的为基因型 H1 和 H3，其中 H1 分布在云南中部及四川的冕宁和九龙地区，云南中部为其主要分布地区；而 H3 从甘肃文县沿四川盆地西部边缘一直分布到分云南西北部地区，贵州施秉居群中也有分布，其中云南西北部及四川西南部为主要分布区（图 2，表 1）。基因型 H2 分布在居群 1、12、13、14、19、24 和 27 中，除甘肃文县（居群 1）外，呈现从云南西北部到云南中部到云南中北部，再到贵州（居群 27）的分布格局。H4 和 H5 也呈现出在甘肃文县（居群 1）、云南西北部（居群 14）和云南中北部（居群 19）的分布式样。H7 仅分布在云南中北部的三个居群中（居群 20 和 21、22），H11 仅分布在云南中北部的两个居群中（居群 23 和居群 25），基因型 H8 分布在四川西南部（居群 16）、云南西北部（居群 8、13 和 15）以及贵州地区（居群 27）。H6 为居群 14 所特有，H10 为居群 13 所特有，H12 和 H13 仅分布在居群 2 中，H15 仅分布在居群 1 中，H16 和 H17 仅分布在居群 17 中，H18、H19 和 H20 仅分布在居群 18 中，H21 仅分布在居群 27 中。因此，ITS 基因型主要分布模式可以归纳为：A.以 H3 为代表的"甘肃-川西南-滇西北-贵州"地区分布类型，以 H1 为代表的"川西南-滇中" 地区分布类型；B."四川盆地边缘"特有基因型分布类型，如 H12、H13、H15 等。出现频率较高的单倍型 H1 和 H3 位于网状进化图的中间位置，同时网状进化图出现多个环状结构，说明核基因重组事件的发生（图 4）。

居群的 SSD 值以及糙度指数 *r* 值都为不显著的正值($P > 0.01$)；中性检验表明 Tajima's

D (-1.14)为负值，但它不显著小于零($P > 0.1$)，Fu and Li's F 为 0.64，失配分布曲线为双峰曲线（图 5），观测值背离了期望值，违背了居群扩张模型。由此推断居群未发生过扩张而是处于动态平衡，这与叶绿体 DNA 的分析结果相一致。

ITS 数据分析显示异叶泽兰总的遗传多样性（Ht）为 0.712，居群内平均遗传多样性（Hs）为 0.325，居群间遗传分化系数 Gst 值 为 0.543 、Nst 值为 0.370，Nst 小于 Gst。 AMOVA 分析结果表明，异叶泽兰 58.44%的遗传变异发生在居群间，其余 41.56%发生在居群内，固定指数 Fst = 0.584。同时，统计分析显示异叶泽兰遗传距离和地理距离呈显著正相关（$r = 0.43$, $P = 0$）。

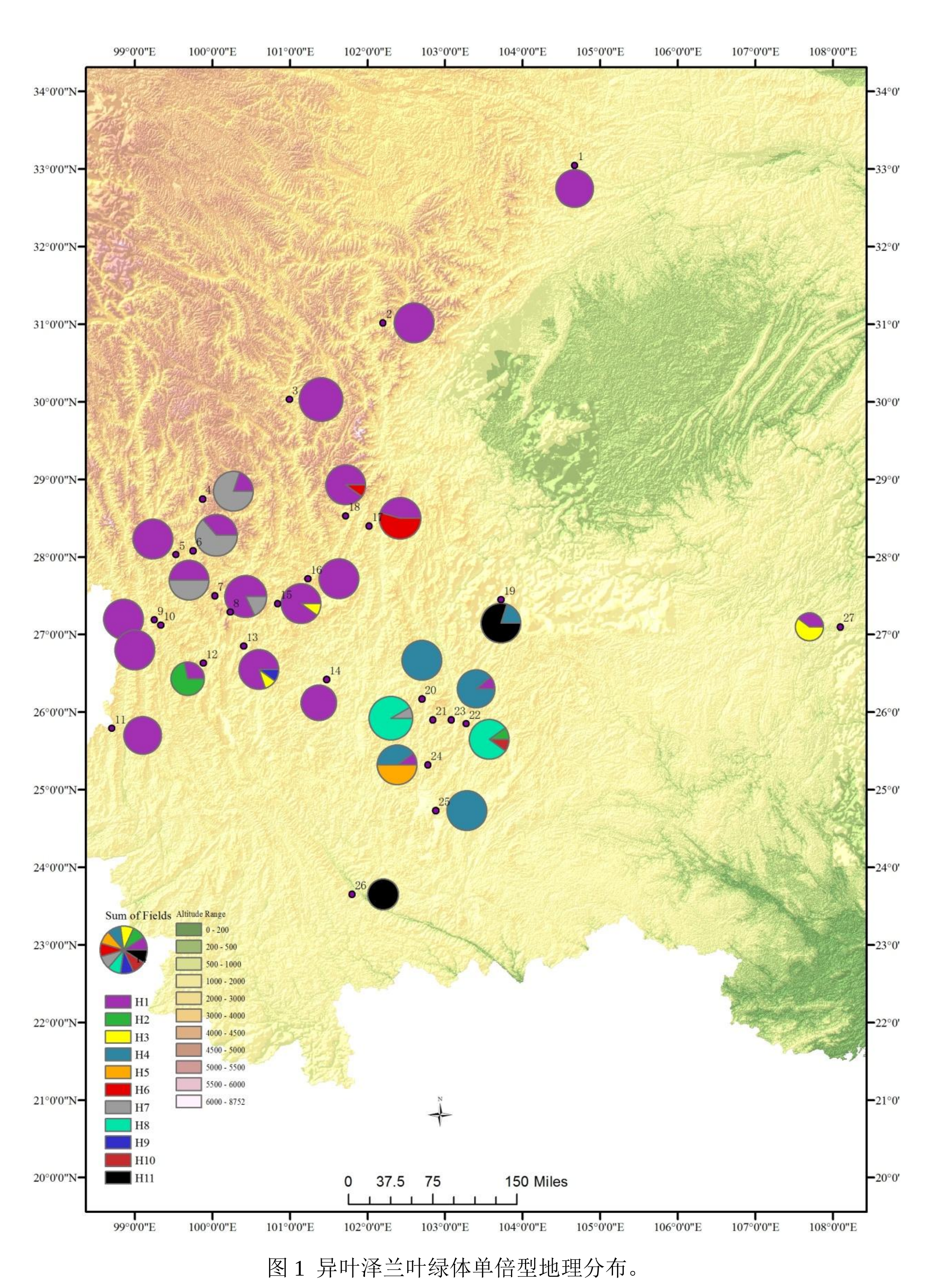


图 1 异叶泽兰叶绿体单倍型地理分布。

Fig. 1 Geographical distribution of combined cpDNA haplotypes of *Eupatorium heterophyllum*

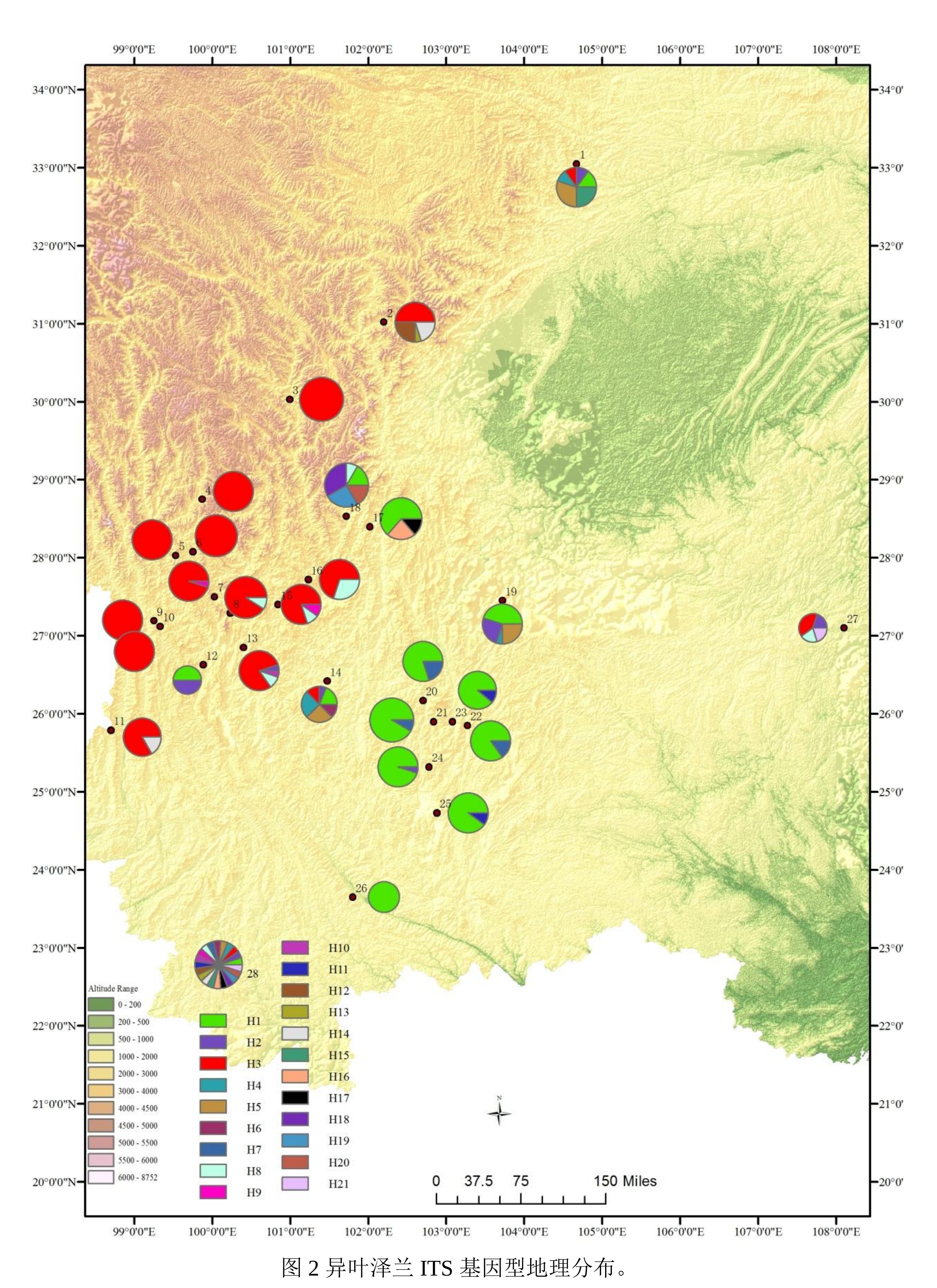
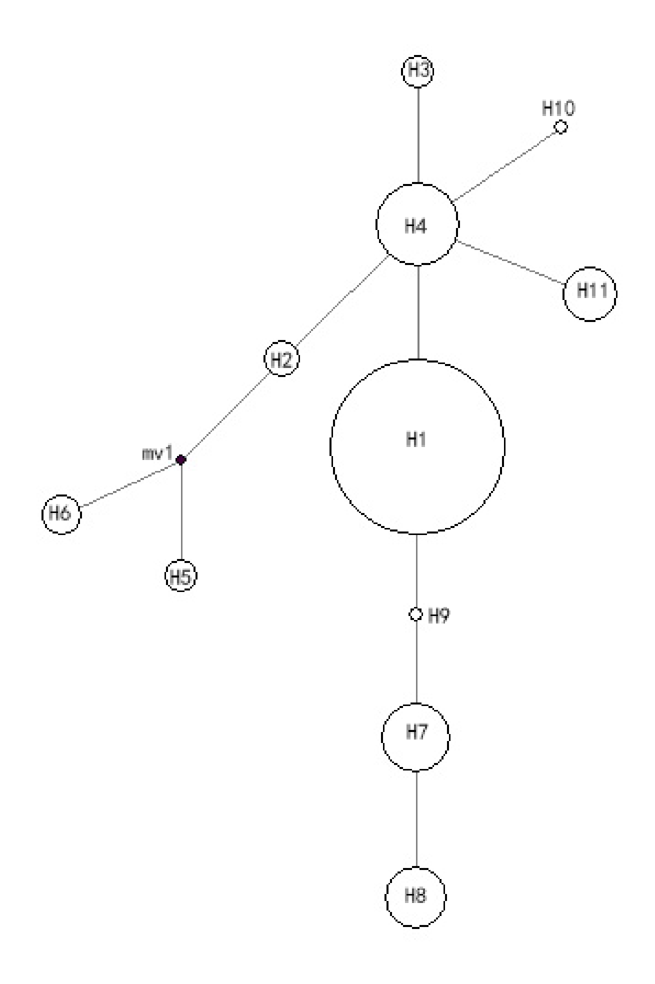


图 2 异叶泽兰 ITS 基因型地理分布。

Fig.2 Geographical distribution of ITS genotypes of *Eupatorium heterophyllum*



注：图中每个圆圈代表一种单倍型，圆圈的大小与单倍型的频率成正比，每一分支代表一次突变，黑色的小圆圈代表缺失单倍型（mv）。下同。

Note: Each circle represents one haplotype, the size of circles corresponds to the frequency of each haplotype, each branch represents one mutation, and the black open circle represents hypothetical missing haplotype (mv). The same below.

图 3 叶绿体 DNA 联合分析的单倍型网状进化树

Fig.3 Network analysis of the combined cpDNA sequences

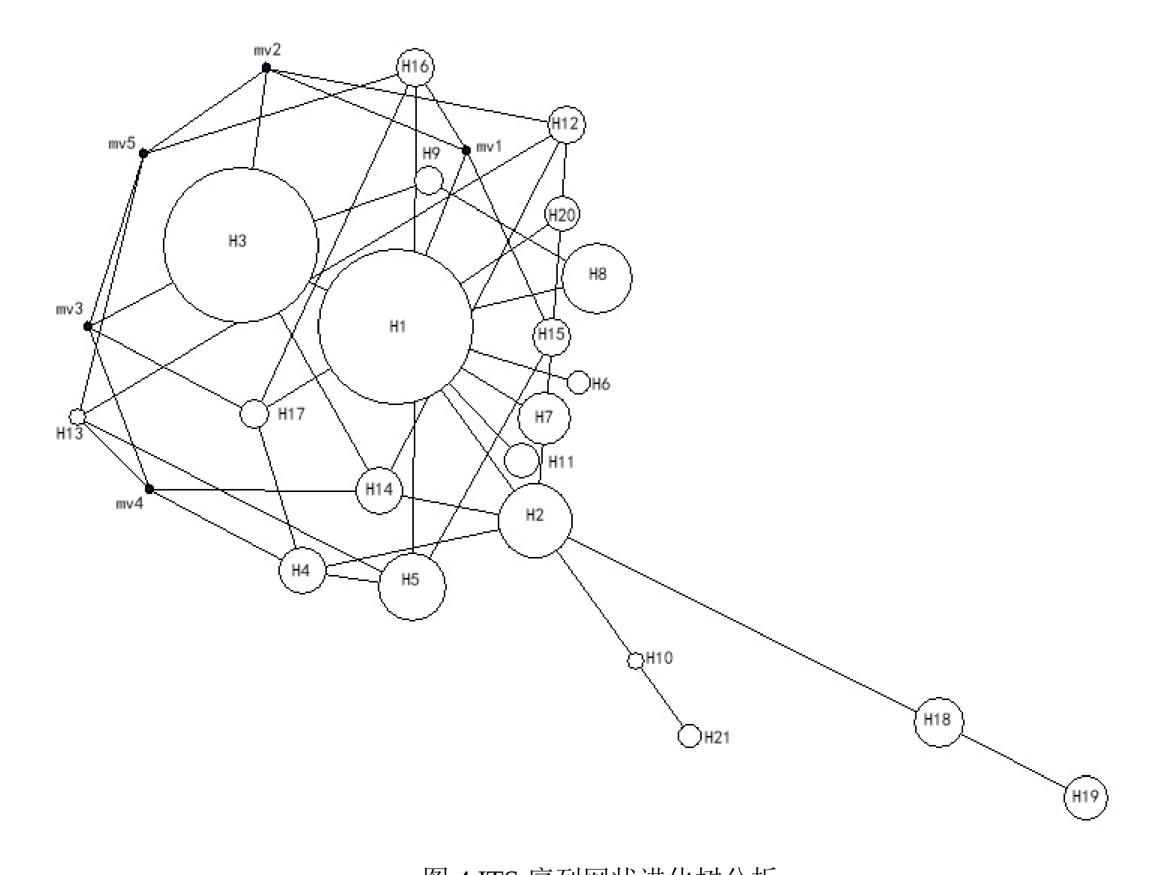


图 4 ITS 序列网状进化树分析

Fig.4 Network analysis of the ITS sequences

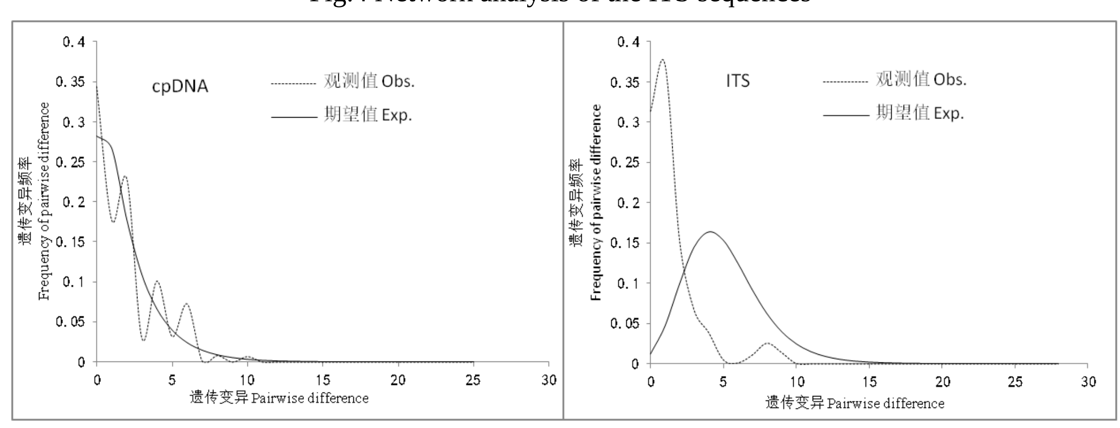


图 5 叶绿体 DNA 序列数据的歧点分布（左）和 ITS 序列数据的歧点分布（右）

Fig.5 Mismatch distribution for cpDNA data (left) and mismatch distribution for ITS data (right)

3 讨论

3.1 异叶泽兰的遗传多样性和遗传结构

本研究中，我们对 27 个居群的 261 个个体的三个 cpDNA 片段及 ITS 进行了测序和分析，三个 cpDNA 片段联合分析后共生成 11 个单倍型, ITS 序列经 PHASE 拆分后共生成 21 个单倍型，表现出较高的单倍型多样性。在物种水平上，cpDNA 的核苷酸多态性（π）为 0.001 61，ITS 序列核苷酸多态性为 0.002 35。在菊科植物中，内蒙古革苞菊 *Tugarinovia mongolica* 是菊科一个单种属植物，包含一变种 *Tugarinovia mongolica* var. *ovatifolia*，原变种分布在内蒙古北部地区，其卵叶变种分布在内蒙古南部。基于两个叶绿体 DNA 片段（*psbA-trnH* 和 *psbK-psbI*）的数据分析表明，内蒙古革苞菊具有非常高的核苷酸多样性（π = 0.009 2）和单倍型多样性(*Hd* = 0.908 6)，两个变种之间遗传分化明显(Zhao et al., 2019)。白菊木（*Leucomeris decora*）为菊科落叶小乔木，其 *trnQ-rps16*, *rpl16* 和 *rpl32-trnL* 联合数据的核苷酸多态性为 π = 0.001 02，而变异率相对较高的核基因片段 *GAPDH* 的 π = 0.002 37（Zhao & Gong, 2012）。鹿蹄橐吾（*Ligularia hodgsonii*）为中国-日本间断分布的菊科橐吾属植物，在中国主要是围绕四川盆地分布，其 23 个居群的三个叶绿体片段联合分析(*trnQ-5'rps16*, *trnL-rpl32* 和 *psbA-trnH*)的核苷酸多态性 π = 0.002 99，单倍型多态性为 *Hd* = 0.847(Wang et al., 2013)。因此，与这些菊科植物相比，异叶泽兰物种水平的核苷酸多态性和单倍型多态性都相对较低。但是，在居群水平，ITS 数据显示四川盆地边缘的几个居群存在相对较高的单倍型多样性（表 1，图 2）。

cpDNA 单倍型数据显示居群水平总的遗传多样性（*H*t = 0.764）大于居群内平均遗传多样性（*H*s = 0.250），同样，ITS 数据显示总的遗传多样性（*H*t = 0.746）也大于居群内平均遗传多样性（*H*s = 0.382)。AMOVA 分析表明，异叶泽兰居群间遗传变异高于居群内（cpDNA：*F*st = 0.655；nITS：*F*st = 0.584）。而 Permut 分析显示居群水平的遗传分化系数相对较高（cpDNA：*G*st = 0.679，*N*st= 0.655； nITS：*G*st = 0.543，*N*st = 0.370）。Petit et al.（2005）曾统计了 124 种被子植物的属于母性遗传的分子标记遗传分化系数 *G*st 平均值和 77 种被子植物的属于双亲遗传的分子标记遗传分化系数 *G*st 平均值。结果显示，属于母性遗传的遗传分化系数 *G*st 平均值为 0.637，而属于双亲遗传的遗传分化系数 *G*st 值平均为 0.184，异叶泽兰分化系数高于这两个值。以上数据都表明，异叶泽兰居群间存在较明显的遗传分化。然而，由于 *N*st 值小于 *G*st 值，异叶泽兰的分布不具有明显的谱系地理结构（Pons & Petit, 1996）。但是，从单倍型分布式样看，却存在着较明显的“甘肃-川西南-滇西北-贵州”和“滇中”两个相对分离的分布区，两个分布区都存在各自特有单倍型和主要单倍型。然而单倍型网状进化树显示，两个分布区所拥有的单倍型并没有各自形成两大谱系分支，同时两个分布区间也存在分布频率相对较低的共享单倍型。作为一种多年生菊科植物，异叶泽兰具有较强的适应能力，而种子具有较强的远距离传播能力，两分布区间应该存在较强的基因交流，这可能是导致异叶泽兰遗传多样性分布式样的主要原因。

3.2 异叶泽兰的居群历史动态

谱系地理学研究的主要目的之一是推测第四纪冰期时某物种的避难所及冰后期分布范围的扩展（Avise, 2000; Liu et al., 2012）。青藏高原东部及邻近的中国西南地区，分布着大量的古老种和新起源种，其中许多植物的分布范围在冰后期发生过扩张（Liu et al., 2012；Qiu et al., 2011），但也有未生扩张的物种，如偏花报春（*Primula secundiflora*）（Wang et al., 2008）。而异叶泽兰作为分布在青藏高原东部和横断山脉的物种，中性检验和失配分析表明其未发生过居群的扩张。

冰期时的避难所往往会保留较高的遗传多样性和单倍型多样性，而单倍型分布能够反映一个物种的地理分布格局特征 (Hewitt, 1996, 2000;Petit et al., 2003)。根据溯祖理论，分布

频率较高的，位于网状进化树中间位置的单倍型可能为较古老的单倍型，而居群特有单倍型可能是通过近期辐射分化衍生而来的较年轻的单倍型（Emerson et al., 2001）。依据 Network 分析结果，异叶泽兰叶绿体 DNA 两个单倍型 H1 和 H4 以及 ITS 两个单倍型 H1 和 H3 分布的地理范围较广，且位于网状结构的内部位置，可能为古老单倍型（Templeton et al., 1992; Crandall & Templeton, 1993）。其中，叶绿体 DNA 单倍型 H1 和 ITS 的单倍型 H3 的广泛分布于甘肃-川西南-滇西北一带及贵州地区，而叶绿体 DNA 单倍型 H4 和 ITS 的单倍型 H1 则分布于云南中部地区。由此推测，横断山区南部（川西南-滇西北）和云南中部可能是异叶泽兰在第四纪冰期尤其是末次冰盛期（LGM）时的两个避难所所在地。

参考文献：

LI XW, LI J, 1993. A preliminary floristic study on the seed plants from the region of Hengduan Mountain [J]. Acta Bot Yunnan, 15(3): 217-231. [李锡文和李捷，1993. 横断山脉地区种子植物区系的初步研究[J]. 云南植物研究, 15(3): 217-231.]

LIN R, CHEN YL, SHI T, 1985. Compositae (1) [M]// Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Beijing: Science Press: 54-69. [林容，陈艺林，石铸，1985. 中国植物志: 第 74 卷[M]. 北京: 科学出版社: 54-69.

GENGJI Z, LI Y, JIA L, et al., 2018. Phylogeography of *Saxifraga tangutica* Engl. (Saxifragaceae). Acta Bot Boreal-Occident Sin, 38(2): 370-380. [更吉卓玛，李彦，贾留坤等，2018. 唐古特虎耳草谱系地理学研究[J]. 西北植物学报，38（2）：370-380.]

SUN H, 2002. Evolution of Arctic-Teriary flora in Himalaya-Hengduan Mountain. Acta Bot Yunnan, 24(6): 671-688. [孙航，2002. 北极-第三纪成分在喜马拉雅-横断山的发展及演化[J]. 云南植物研究，24（6）：671-688.]

YU H, ZHANG Y, 2013. Advances in phylogeography of alpine plants in the Tibetan Plateau and adjacent regions [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 33(6): 1268-1278. [于海彬，张镱锂，2013. 青藏高原及其周边地区高山植物谱系地理学研究进展[J]. 西北植物学报，33（6）：1268-1278.]

AVISE JC, 2000. Phylogeography: the history and formation of species[M]. Cambridge, Massachusetts, London, England: Harvard University Press.

CHEN Y, TAKAYUKI K, HIND DJN, 2011. Tribe Eupatorieae. In: WU ZY, RAVEN PH, HOND DY, (eds.). Flora of China (Volume 20-21). Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press: 879-891.

CRANDALL KA, TEMPLETON AR, 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction [J]. Genetics, 134(3): 959-969.

DOYLE JJ, DOYLE JL, 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues [J]. Phytochem Bull, 19: 11–15.

EXCOFFER L, LISHCHER HEL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. Mol Ecol Resour, 10: 564-567.

EMERSON BC, PARADIS E, THEBAUD C, 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences [J]. Trends Ecol Evol, 16:707-716

HEWITT GM, 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role, in divergence and speciation [J]. Biol J Linn Soc, 58(3): 247-276.

HEWITT G, 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages [J]. Nature, 405: 907-913.

ITO M, WATANABE K, KITA K, et al., 2000. Phytogeography of *Euapatorium* (Eupatorieae, Asteraceae): Insights from sequence data of the nrDNA regions and cpDNA RFLP [J]. J Plant Res, 113: 79-89.

KING RM, ROBBINSON H, 1970. *Eupatorium*, a composite genus of Arcto-Tertiary distribution [J]. Taxon, 19: 769-774.

LIBRADO P, ROZAS J, 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 25: 1451-1452.

LIU JQ, SUN YS, GE XJ, et al., 2012. Phylogeographic studies of plants in China: Advances in the past and directions in the future [J]. J Syst Evol, 50(4): 267-275.

PETIT RJ, AGUINAGALDE I, BEAULIEU JL, et al., 2003. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity [J]. Science, 300(5625): 1563-1565.

PETIT RJ, DUMINIL J, FINESCHI S, et al., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations [J]. Mol Ecol, 14(3): 689-701.

PONS O, PETIT RJ, 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles [J]. Genetics, 144(3): 1237-1245.

QIN YX, FU CX, COMES HP, 2011. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora [J]. Mol Phylogen Evol, 59:225-244

SAITO Y, MUKAI T, IWAMOTO Y, et al., 2014. Germacranolides and their diversity of *Eupatorium heterophyllum* collected in P.R.China [J]. Chem Pharm Bull, 62(11): 1092-1099.

SCHILLING EE, PANERO JL, COX PB, 1999. Chloroplast DNA restriction site data support a narrowed interpretation of *Eupatorium* (Asteraceae) [J]. Plant Syst Evol, 219: 209–223.

SCHMIDT GJ, SCHILLING EE, 2000. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data [J]. Amer J Bot, 87(5): 716–726.

SHAW J, LICKEY EB, BECK J, et al., 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast and sequences for phylogenetic analysis [J]. Amer J Bot, 92(1): 142-166.

SHAW J, LICKEY EB, SCHILLING EE, et al., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III [J]. Amer J Bot, 94(3): 275-288.

SWOFFORD DL, 2002. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 b10 [M]. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

TEMPLETON AR, CRANDALL KA, SING CF, 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. cladogram estimation [J]. Genetics,132(2): 619-633.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWINAK F, et al., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res, 25: 487-4882.

WANG FY, GONG X, HU CM, et al., 2008. Phylogeography of an alpine species *Primula secundiflora* inferred from the chloroplast DNA sequence variation [J]. J Syst Evol, 46: 13-22.

WANG JF, GONG X, CHIANG YC, et al., 2013. Phylogenetic patterns and disjunct distribution in *Ligularia hodgsonii* Hook. (Asteraceae) [J]. J Biogeogr, 40: 1741-1754

WATANABE K, ITO M, YAHARA T, et al., 1990. Numerical analyses of karyotypic diversity in the genus *Eupatorium* (*Compositae*, *Eupatorieae*) [J]. Plant Syst Evol, 170: 215-228.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S., et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 315–322.

YU H, FAVRE A, SUI X, et al., 2019. Mapping the genetic patterns of plants in the region of the Qinghai–Tibet Plateau: Implications for conservation strategies [J]. Diver Distrib, 25: 310–324.

ZHAO YJ, GONG X, 2012. Genetic structure of the endangered *Leucomeris decora* (Asteraceae) in China inferred from chloroplast and nuclear DNA markers [J]. Conserv Genet, 13:271–281.

ZHAO Y, PAN B, ZHANG M, 2019. Phylogeography and conservation genetics of the endangered *Tugarinovia mongolica* (Asteraceae) from Inner Mongolia, Northwest China [J]. PLoS ONE, 14(2): e0211696.